

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 15 JAN 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT****Aktenzeichen:**

102 53 526.4

Anmeldetag:

16. November 2002

Anmelder/Inhaber:Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt am Main/DE**Bezeichnung:**Endotheliale Zellen als Diagnoseinstrument
bei kardiovaskulären Erkrankungen**IPC:**

C 12 Q 1/02

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 27. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt**Der Präsident**

Im Auftrag

Stech

BEST AVAILABLE COPY

Endotheliale Zellen als Diagnoseinstrument bei kardiovaskulären Erkrankungen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur immunzytologischen Bestimmung apoptotischer Endothelzellen und/oder endothelialer Vorläuferzellen in Proben wie z.B. aus peripherem Blut, mittels z.B. Durchflußzytometrie oder mittels eines Festphase-Immuntests, als diagnostisches Instrument bei Patienten, bei denen eine kardiovaskuläre Erkrankung entweder manifest ist oder die ein Risiko für deren Entwicklung tragen, und als ein Instrument, mit dem die Prävention und das therapeutische Management einer derartigen Erkrankung verbessert wird.

Die Diagnose einer kardiovaskulären Erkrankung wird häufig durch die symptomatische Manifestation atherosklerotischer Läsionen, sogenannter Plaques, veranlaßt, die durch einen akuten arteriellen Verschuß zum Ausdruck kommt. Derartige Ereignisse, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall, treten auf, wenn ein vorher bestehender atherosklerotische Plaque destabilisiert und abgetragen wird oder sogar abreißt. Zum Zeitpunkt der Manifestation dieser Erkrankung sind zumeist frühere, stabile Stadien einer Atherosklerose jahrelang vorausgegangen, die nicht unbedingt zu subjektiven Beschwerden oder klinisch auffälligen Symptomen geführt haben müssen. Etablierte Verfahren, Patienten mit beginnenden oder progredienten vaskulären Abnormitäten, die ein Risiko für die Entwicklung instabiler Plaques tragen, zu identifizieren, schließen die Dokumentation von Veränderungen des Belastungs-EKG und Ultraschalluntersuchungen der peripheren Arterien ein. Diese Untersuchungen allerdings weisen nur größere Plaques nach, die zu einer signifikanten Stenose und Beeinträchtigung des Blutflusses führen, und im allgemeinen erst unter körperlicher Belastung zu klinischen Symptomen führen.

Als Schlüsselereignis bei der Auslösung von Atherosklerose wird allgemein eine Schädigung von Endothelzellen (*Endothelial Cells*, EC) betrachtet (Ross R. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 115-126). Die Erneuerungsrate von EC ist in jenen Bereichen der Gefäße erhöht, die für eine spätere Entwicklung atherosklerotischer Läsionen besonders anfällig sind (Caplan B.A., Schwartz C.J. *Atherosclerosis*. 1973; 17: 401-417). Dies legt nahe, daß vor Entwicklung der

Läsionen zahlreich ECs absterben. Der programmierte Zelltod (Apoptose) kann daher als eines der wichtigsten möglichen pathobiologischen Ereignisse eingestuft werden, die dafür verantwortlich sind. Tatsächlich induzieren pro-atherogene Stimuli, zu denen traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren wie oxidativer Streß, verursacht durch Rauchen oder Dysproteinämie, gehören, die Apoptose von EC *in vitro*. Die Scherkräfte, welche die laminare Strömung des Blutes verursacht, wirken dagegen deutlich protektiv auf das Überleben von EC, indem die pro-apoptotische Aktivierung durch atherogene Stimuli vollständig unterdrückt wird (Gimbrone M.A., Nagel T., Topper J.N. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1809-1813; Dimmeler S., Haendeler J., Rippmann V., Nehls M., Zeiher A.M. *FEBS Lett.* 1996; 399: 71-74). Darüber hinaus sind jene Bereiche der Gefäße, die der laminaren besonders Strömung ausgesetzt sind, nicht nur durch eine sehr niedrige Erneuerungsrate der EC charakterisiert (Davies P.F., Remuzzi A., Gordon E.J., Dewey C.F. Jr., Gimbrone M.A. Jr. *T Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 2114-2117), diese entwickeln auch eher selten atherosklerotische Läsionen (Caplan B.A., Schwartz C.J. *Atherosclerosis.* 1973; 17: 401-417). Solche Befunde stärken das Konzept eines potentiellen Beitrags der EC-Apoptose zur Entwicklung von Atherosklerose.

Neben histopathologischen Untersuchungen wurde in der Vergangenheit auch mittels immunologischer Experimenten versucht, Spuren einer Endothelschädigung festzustellen. Schon früh wurde von der signifikanten Zunahme einer Endothelämie bei Patienten mit Myokardinfarkt und schwerer, über mehrere Tage andauernder Angina berichtet (Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V., Fabian J. *Klin. Wochenschr.* 1978; 56: 1033-1036). Mit der Entwicklung eines neuen Zytofluoreszenztests, bei dem an einen monoklonalen Antikörper (S-Endo-1) gekoppelte immunomagnetische *Beads* verwendet wurden, wobei der Antikörper gegen kultivierte Endothelzellen der menschlichen Umbilikalvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) gerichtet (George F., Poncelet P., Laurant J.C., Massot O., Arnoux D., Lequeux N., Ambrosi P., Chicheportiche C., Sampol J. *J. Immunol. Methods.* 1991; 139: 65-75), konnten sowohl bei Patienten mit Mittelmeer-Fieber (Drancourt M., George F., Brouqui P., Sampol J., Raoult D. *J. Infect Dis.* 1992; 166: 660-663) als auch bei Patienten mit einer Infektion durch das Cytomegalievirus (CMV) (Grefte A., van der Giessen M., van Son W., The TH. *J. Infect Dis.* 1993; 167: 270-277) flottierende EC in der Zirkulation nachgewiesen werden. Unter Verwendung eines adaptierten immunzytologischen Verfahrens, das auf einem Antikörper beruht, der gegen ein im wesentlichen identisches natives Epitop (Klon P1 H12) gerichtet ist, wurde die Konzentration an zirkulierenden EC in normalen gesunden Erwachsenen mit $2,6 \pm 1,6/\text{ml}$ peripheres Blut bestimmt (Solovey A., Lin Y., Browne P., Choong S., Wayner E.,

Hebbel R.P. *N. Engl. J. Med.*; 1997; 337: 1584-1590). Messungen von Mikropartikeln, deren Abstoßen durch EC ein Parameter für deren Apoptose sein könnte, gefolgt von einer Färbung von EC-Markern, zeigten bei Patienten mit akutem Herzsyndrom (*Acute Cardiac Syndrome*) vermehrte Mikropartikel endothelialen Ursprungs (Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Leseche G., Freyssinet J.M., Tedgui A. *Circulation*. 1999; 99: 348-353). Auch wurde gezeigt, daß bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, vermehrt Mikropartikel auftraten. Obwohl der Nachweis von Mikropartikeln, die auch nach einer pro-inflammatorischen Aktivierung des Endothels freigesetzt werden können, eine Diskriminierung zwischen entzündlicher Aktivierung und Apoptose der EC nicht erlaubt, wurde eine Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung demonstriert (Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P.G., Freyssinet J.M., Tedgui A. *Circulation*. 2000; 101: 841-843).

Frühere Ansätze, Patienten mit einem Risiko zur Entwicklung instabiler atherosklerotischer Läsionen zu identifizieren, beruhten auf biophysikalischen Funktionsbestimmungen des Gefäßendothels durch Messungen am Unterarm oder Messungen des koronaren Blutflusses, wobei sich gezeigt hat, daß diese Ergebnisse mit dem späteren Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse tatsächlich korrelieren. Diese Methodik erfordert jedoch eine arterielle Katheterisierung, was ihren Einsatz für die Beurteilung eines zukünftigen kardiovaskulären Risikos bei einer asymptomatischen Population stark einschränkt. Als nicht-invasive Alternative wurde eine Prognose durch verschiedene biochemische Marker in Proben von peripherem Blut vorgeschlagen, da ein Anstieg der Plasma-Konzentrationen dieser Faktoren in der systemischen Zirkulation mit der Aktivierung und funktionellen Beeinträchtigung des Endotheliums einhergeht. Da allerdings pro-inflammatorische Prozesse den Hauptmechanismus darstellen, der einer endothelialen Aktivierung und der Progression einer kardiovaskulären Störung zugrunde liegt, weisen die Pathogenese der Atherosklerose ebenso wie die der systemischen Herzinsuffizienz Eigenschaften auf, die sie mit entzündlichen Erscheinungen anderer Erkrankungen teilen. Dazu gehören insbesondere die Zunahme pro-inflammatorischer Zytokine und anderer Plasmaproteine. Als Folge davon fehlt allen gegenwärtig verfügbaren, im Plasma nachweisbaren Indikatoren einer vaskulären Aktivierung die diagnostische Spezifität und sie sind deshalb auch nur von beschränktem klinischem Nutzen für die Stratifizierung eines kardiovaskulären Risikos.

Jüngste Strategien sind deshalb darauf gerichtet, beschädigte EC, die von atherosklerotischen Plaques abgestoßen werden, als aussichtsreichen Marker einer vaskulären Vulnerabilität zu

messen. Mit Hilfe magnetischer *Beads* zur selektiven Isolierung zirkulierender Endothelzellen wurde in Proben von peripherem Blut von Patienten, die unter koronaren Herzerkrankungen verschiedener Stadien litten, gezeigt, daß eine Zunahme der Anzahl dieser Zellen in der Zirkulation mit dem Vorhandensein akuter koronarer Symptome im Zusammenhang stand (Dignat-George et al.). Aus methodischen Gründen allerdings konnten diese Autoren nur eine sehr kleine Anzahl an Endothelzellen, die in der Zirkulation flottieren, nachweisen, und es gelang ihnen nicht, Anzeichen eines apoptotischen Zelltods dieser Zellen zu charakterisieren.

In letzter Zeit hat die Entwicklung der Multicolor-Durchflußzytometrie die notwendigen Voraussetzungen für eine genauere Analyse von im peripheren Blut zirkulierenden Zellen geschaffen. Durch diese Technologie wurde die Anzahl zirkulierender EC in gesunden menschlichen Probanden mit 9,1/µl bestimmt. Rund 15% davon wiesen Anzeichen einer EC-Aktivierung auf, d.h. lieferten ein positives Ergebnis bei immunzytochemischer Färbung von CD105 und CD106 (Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. *Blood*. 2001; 97: 3658-3661).

Jüngste Befunde liefern erste Hinweise, daß sich die Apoptose von EC auch *in vivo* ereignen könnte (Rössig L., Dimmeler S., Zeiher A.M. *Basic Res. Cardiol.* 2001; 96: 11-22). In einer Tierstudie wurde gezeigt, daß eine verstärkte Apoptose von EC in den Aorten und Femurarterien gealterter Affen mit einer Dysfunktion des Gefäßendothels einherging (Asai K., Kudej R.K., Shen Y.T., Yang G.P., Takagi G., Kudej A.B., Geng Y.J., Sato N., Nazareno J.B., Vatner D.E., Natividad F., Bishop S.P., Vatner S.F. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1493-1499). Eine derartige endotheliale Dysfunktion stellt ein allgemein anerkanntes Merkmal dar, das bereits während früher Stadien einer Atherosklerose auf deren spätere Manifestation hinweist. Als bisher deutlichstes Anzeichen für das Auftreten von EC-Apoptose *in vivo* zeigte die histopathologische Analyse atherosklerotischer Plaques in der menschlichen Karotis eine EC-Apoptose im *downstream* gelegenen Teil der Plaques (Tricot O., Mallat Z., Heymes C., Belmin J., Leseche G., Tedgui A. *Circulation*. 2000; 101: 2450-2453).

Interessant sind auch jüngere Einblicke in die Pathomorphologie atherosklerotischer Plaques, die mit akuten koronaren Syndromen oder plötzlichem koronarem Tod im Zusammenhang stehen. Sie liefern einen soliden Beweis dafür, daß in erheblichem Ausmaß auch Plaque-Erosion zusätzlich zu einem kompletten Abreißen der Plaques zum Auslösen des dramatischen Ereignisses beitragen (Virmani R., Kologdie F.D., Burke A.P., Farb A., Schwartz S.M.

Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 2000; 20: 1262-1275). Eine Plaque-Erosion ist durch das Fehlen von Endothel charakterisiert, wobei nur eine geringe Entzündung der exponierten Intima auftritt (Farb A., Burke A.P., Tang A.L., Liang T.Y., Mannan P., Smialek J., Virmani R. *Circulation.* 1996; 93: 1354-1363). Bedeutsam ist, daß eine Plaque-Erosion für ungefähr 40% der Fälle von Thrombose-induziertem plötzlichen Tod verantwortlich ist (Farb A., Burke A.P., Tang A.L., Liang T.Y., Mannan P., Smialek J., Virmani R. *Circulation.* 1996; 93: 1354-1363). Darüber hinaus sind Plaque-Erosionen bei Diabetikern oder prä-menopausalen Frauen durchaus üblich, und sie treten auch bei Personen mit erhöhtem CRP (C-reaktives Protein)-Serumspiegel vermehrt auf (Burke A.P., Tracy R.P., Kolodgie F., Malcom G.T., Zieske A., Kutys R., Pestaner J., Smialek J., Virmani R. *Circulation.* 2002; 105: 2019-2023).

Neuere Befunde haben gezeigt, daß die Plaque-Instabilität und damit deren Potential, ein lebensbedrohendes kardiovaskuläres Ereignis auszulösen, nicht vom Ausmaß der Plaques abhängt. Statt dessen sind instabile Plaques, die besonders dazu neigen, abzureißen oder zu erodieren, durch eine Destabilisierung der Plaque-Struktur charakterisiert. Die klinischen Bilder einer akuten Transformation der vaskulären Läsionen gehen mit einer vermehrten EC-Apoptose einher, was einen Marker für die Plaque-Instabilität darstellt. Eine proinflammatorische Aktivierung und gesteigerte Apoptose des Endothel ist bei dem nicht-atherosklerotisch bedingten Herzversagen ebenfalls verbreitet. Eine Quantifizierung der Apoptose mittels der Analyse von Endothelzellen, die in die Zirkulation abgestoßen werden (*Shedding*), könnte das Ausmaß der Erkrankung feststellen, bevor die klinische Manifestation einsetzt.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem das Risiko, ein kardiovaskulär nachteiliges Ereignis, das mit unkontrollierten Veränderungen der Endothelfunktion in Zusammenhang steht, zu erleiden, mit Hilfe eines individuellen Risikoprofils abgeschätzt werden kann. Dies soll durch die quantitative und kritische Bestimmung von abgestoßenen, flottierenden und zirkulierenden Endothelzellen und/oder endothelialen Vorläuferzellen erfolgen, die einen Indikator für das geschädigte Endothel darstellen. Aufgrund des Risikoprofils können dann geeignete Gegenmaßnahmen durch den behandelnden Arzt durchgeführt werden, um den Patienten positiv zu beeinflussen und das nachteilige Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern.

Diese Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang stehenden endothelialen Zellen in einer Probe gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Schritte von: (a) Gewinnung einer zu untersuchenden, endotheliale Zellen enthaltenden Probe; (b) Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an eines oder mehrere der folgende Markermoleküle der endothelialen Zellen binden: i) Endothelzell-Marker und/oder Apoptose-Marker; oder ii) Endothelzell-Marker und/oder Marker endothelialer Vorläuferzellen; (c) Identifizierung und/oder Quantifizierung der endothelialen Zellen auf Basis der gebundenen Moleküle unter der Verwendung immunzytologischer Methoden; und (d) Vergleich des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit dem Ergebnis einer Referenzprobe.

Die Ergebnisse der im Rahmen der Erfindung durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß Patienten mit koronarer Arterienerkrankung (*Coronary Artery Disease*, CAD) signifikant erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden apoptotischen EC aufweisen. Diese erhöhten Werte sind streng mit der Aktivität der Erkrankung assoziiert, denn die höchsten Konzentrationen wurden bei Patienten mit ACS beobachtet. Dementsprechend könnte die Anzahl an zirkulierenden apoptotischen EC den Verlauf einer subklinischen Plaque-Erosion widerspiegeln. In den Untersuchungen im Rahmen der Erfindung wurden tatsächlich gesteigerte Konzentrationen an apoptotischen Endothelzellen in ähnlichen Patientengruppen beobachtet, für die ein verstärktes Auftreten von Plaque-Erosionen berichtet wurde.

Bei Patienten mit Myokardinfarkt werden endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert (Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T. *Circulation*. 2001; 103: 2776-2779). Da neuere experimentelle Untersuchungen zeigen, daß endotheliale Vorläuferzellen zu einer Regenerierung der entkleideten arteriellen Abschnitte beitragen können (Walter D.H., Rittig K., Bahlmann F., Kirchmair R., Silver M. Murayama R., Nishimura H., Losordo D.W., Asahara T., Isner J.M. *Circulation*. 2002; im Druck), besteht die Möglichkeit, daß der Pool an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen eine endogene regenerative Kraft nach endothelialer Verletzung darstellen könnte. Tatsächlich waren die Konzentrationen an endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit stabiler CAD etwa 2,3fach erhöht. Allerdings gehen gesteigerte Konzentrationen an apoptotischen EC mit signifikant verminderten Konzentrationen an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen einher. Diese Ergebnisse

können derart interpretiert werden, daß eine Gefäßverletzung zu einem *Homing* der endothelialen Vorläuferzellen führen könnte, wodurch der Gesamt-Pool an zirkulierenden EC reduziert wird. Andererseits könnte die in Patienten mit CAD beobachtete Reduktion zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen (Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. *Circ. Res.* 2001; 89: E1-7), die von einer verstärkten EC-Apoptose begleitet wird, die Regeneration des Endothels durch Vorläuferzellen begrenzen und dadurch die funktionelle Integrität des Endothel-Monolayers zusätzlich beeinträchtigen. Weitere experimentelle Untersuchungen in Tiermodellen sind erforderlich, um diese komplexen Prozesse zu verstehen.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die endothelialen Zellen aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammen. Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu analysierenden, bzw. identifizierten und/oder quantifizierten endothelialen Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus apoptotischen Endothelzellen, endothelialen Vorläuferzellen und reifen Endothelzellen.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die zu analysierende Probe jede Probe sein, die endotheliale Zellen enthält. Die Probe kann vorbehandelt sein, wobei peripheren Blut z.B. ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird, es kann weiterhin eine Lyse der Erythrozyten zwischen Schritt (a) und (b) durchgeführt werden oder die Probe kann direkt verwendet werden. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut, Zellkultur-Suspensionen und Suspensionen, die von einer Gefäßwand mechanisch, chemisch und/oder enzymatisch abgelöste Zellen enthalten. Solche enzymatische Ablösung kann z.B. durch Collagenase erhalten werden. Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe peripheres Blut ist.

Ein wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an eines oder mehrere der Markermoleküle der endothelialen Zellen binden. Diese Moleküle können aus einer sehr großen Vielzahl von für endotheliale Zellen spezifischen Molekülen ausgewählt sein. Bevorzugt ist, daß die an einen Marker bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern oder Teilen oder Fragmenten davon und Rezeptorliganden oder Teilen davon. Insbesondere als Rezeptorliganden kommen eine sehr große Zahl von Peptiden, Proteinen und kleine-

ren Molekülen in Frage, wie etwa Hormone oder ähnliches. Diese spezifisch gebundenen Moleküle werden dann als Basis für die weitere Analyse, Identifizierung und/oder Quantifizierung der endothelialen Zellen verwendet. Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyklonale Antikörpern, monoklonale Antikörpern, Fab-Fragmente, *Single Chain*-Antikörper und Diabodies umfassen.

Gemäß eines weiteren Aspekts des Verfahrens der vorliegenden Erfindung können Komponenten des Verfahrens an eine feste Phase gebunden vorliegen, somit können die an einen Marker bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen. Als Matrices können eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Materialien verwendet werden, wie zum Beispiel Harz-Matrices und/oder herkömmliche Säulenmatrices. Besonders bevorzugt ist weiterhin ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die an einen Marker bindenden Moleküle an eines oder mehrere Detektionsmoleküle aus der Gruppe bestehend aus Fluoresceinthioisocyanat, Phycoerythrin, Enzymen (zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase) und magnetisches Bead gekoppelt sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens können die an einen Marker bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Detektionsmoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um einen indirekten Nachweis der Bindung des Moleküls an den jeweiligen endothelialen Zellmarker. Solche zweistufigen Nachweise sind dem Fachmann zum Beispiel aus der anti-Antikörper-Nachweisteknik bestens bekannt.

Ein wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Endothelzell-Marker selber, an die die oben genannten Moleküle binden. Diese Marker können aus allen für endotheliale Zellen spezifischen Markern ausgewählt sein. Bevorzugt ist, daß der Endothelzell-Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CD146, von Willebrandt-Faktor (vWF) und *Vascular Endothelial Growth Factor*-Rezeptor 1 (VEGF-Rezeptor-1); der Apoptose-Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Annexin V und PD-ECGF, und die Marker endothelialer Vorläuferzellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus CD133 und CD 34. Dies sind aber nur Beispiele für Marker, von denen aus der Fachmann leicht weitere bestimmen und anwenden kann.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens kann weiterhin mindestens ein weiterer nicht-endotheliale Zellen kennzeichnender Marker nachgewiesen werden, wie z.B. CD45. Dies dient zu einer negativen Abgrenzung der zu identifizierenden und/oder quantifizierenden endothelialen Zellen von anderen in der Probe enthaltenen Zellen.

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können zur Identifizierung und/oder Quantifizierung der endothelialen Zellen immunzytologischen Verfahren angewandt werden. Dabei sind alle Verfahren geeignet, die eine spezifische Bestimmung anhand der Marker/Molekül-Interaktion erlauben. Bevorzugt sind Verfahren, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Durchflußzytometrie und Festphase-Immuntests. Dabei können auch sogenannte „Cell-Sorter“ verwendet werden.

Die ermittelten Daten der Untersuchung(en) der endothelialen Zellen aus der Probe werden üblicherweise mit einer Referenzprobe verglichen. Welche Probe als Referenzprobe dienen kann, wird insbesondere von der Art der untersuchten Probe und der Krankengeschichte des Individuums, aus dem die zu untersuchende Probe stammt, abhängen. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die Referenzprobe aus einem oder dem Mittelwert mehrerer Säugetiere stammt, in dem/in denen eine kardiovaskuläre Erkrankung ausgeschlossen wurde. Dies muß aber nicht zwangsläufig so sein, wenn z.B. das Fortschreiten einer Erkrankung bestimmt werden soll, kann auch eine „alte“ Probe desselben Patienten als Referenzprobe verwendet werden. Dem Fachmann ist offensichtlich, welche Proben als Referenzprobe für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

Für eine Bewertung der ermittelten Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens kann so z.B. das Ergebnis für apoptotische Endothelzellen mit dem Ergebnis für die Gesamtheit an Endothelzellen in Beziehung gebracht werden, und/oder das Ergebnis für apoptotische Endothelzellen mit dem Ergebnis für endotheliale Zellen in Beziehung gebracht werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können die zu diagnostizierenden und/oder prognostizierenden und/oder deren Therapie zu überwachen- den kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz. Es soll jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich das erfindungsge-

mäße Verfahren noch für weitere kardiologische Erkrankungszustände eignet und anwenden läßt.

Die Erfindung stellt bevorzugt ein durchflußzytometrisches Verfahren zur Bestimmung abgestoßener, zirkulierender EC im peripheren Blut zur Verfügung. Es wird ein sensitives und hochspezifisches neues Verfahren verfügbar gemacht, mit dem beschädigtes Endothel, das einer Plaque-Entwicklung vorausgeht, detektiert werden kann und der Übergang vom stabilen zum instabilen atherosklerotischen Phänotyp quantifiziert werden kann. Das Verfahren ermöglicht nicht nur eine höhere Sensitivität im Vergleich zu früheren Verfahren, sondern bietet auch die Möglichkeit, die Zellen im Hinblick auf ihr Überleben und ihren Differenzierungsgrad und ihren Ursprung innerhalb des Gefäßsystems weiter zu charakterisieren. Ein derartiges detailliertes Profil von Anzahl und Eigenschaften apoptotischer, zirkulierender EC liefert Informationen über den Zustand des Endothels, das allen gegenwärtig verfügbaren Markern überlegen ist. Das Verfahren der Durchflußzytometrie kann auch an die Verwendung als Festphase-Immuntest (*Solid-State Immunosorbant Assay*) adaptiert werden, wodurch eine vereinfachte, praktische Anwendung des gleichen Prinzips verfügbar gemacht wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, wobei der Kit Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, unter Umständen zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen umfaßt. Solche Mittel sind bevorzugterweise mindestens ein Antikörper zum Nachweis mindestens eines endothelialen Markers und Mittel zur anschließenden Identifizierung und/oder Quantifizierung der endothelialen Zellen. Der Kit kann außerdem andere Komponenten und/oder Enzyme zur Durchführung der Verfahren der vorliegenden Erfindung, z.B. Gebrauchsanweisungen zur Interpretation der Ergebnisse des Tests im Hinblick auf das Risikoprofil des Patienten und entsprechende Gegenmaßnahmen und Therapievorschlüsse enthalten.

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse der der Erfindung zugrundeliegenden Studie, daß Patienten mit ACS (akuter Myokardinfarkt und instabile Angina) eine dreifache Zunahme an zirkulierenden apoptotischen EC aufweisen. Hypercholesterinämie, Diabetes und erhöhte CRP-Serumspiegel korrelierten signifikant mit gesteigerten Konzentrationen an apoptotischen EC. Die EC-Apoptose wurde durch eine vierwöchige Behandlung der Patienten mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren signifikant reduziert. Insgesamt legen diese Daten nahe, daß eine Messung von zirkulierenden apoptotischen EC ein bisher nicht zugängliches Verfahren für

die Überwachung der Aktivität atherosklerotischer Erkrankungen beim Menschen verfügbar macht. Damit ist sowohl eine Beurteilung des kardiovaskulären Risikos als auch die primäre Diagnose einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung, verbunden mit der prognostischen Stratifizierung von Patienten mit manifester kardiovaskulärer Erkrankung, einschließlich koronarer, peripherer und cerebraler Arterienerkrankung und progressivem kongestivem Herzversagen möglich.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie. Dies geschieht durch die quantitative und kritische Bestimmung von abgestoßenen, flottierenden und zirkulierenden Endothelzellen und/oder endothelialen Vorläuferzellen, die einen Indikator für das geschädigte Endothel darstellen. Aufgrund des daraufhin erstellbaren Risikoprofils können dann geeignete Gegenmaßnahmen durch den behandelnden Arzt durchgeführt werden, um den Patienten positiv zu beeinflussen und das nachteilige Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern. Eine solche Therapie kann erfindungsgemäß die Verabreichung von Lipidsenkern, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Statinen, insbesondere Atorvastatin umfassen. Dem Fachmann sind jedoch weitere mögliche Therapien bekannt, um kardiovaskuläre Erkrankungen zu therapieren, die nach herkömmlichen Schemata erfolgen können.

Weiterhin klären die Ergebnisse der im Rahmen der Erfindung durchgeführten Untersuchung erstmals die Auswirkung klassischer Risikofaktoren für CAD auf die EC-Apoptose. Eine Schlüsselrolle von Lipiden – insbesondere oxidierten Lipide – als Auslöser für die EC-Apoptose ist durch verschiedene Zellkulturexperimente *in vitro* nahegelegt worden (Dimmeler, S., Haendeler J, Galle J., Zeiher A.M. *Circulation*. 1997; 95: 1760-1763; Harada-Shiba M., Kinoshita M., Kamido H., Shimokado K. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 9681-6987). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß die LDL-Serumkonzentrationen signifikant mit einer gesteigerten EC-Apoptose bei Patienten mit CAD korrelieren. Wichtig ist, daß eine Behandlung mit dem Lipidsenker Atorvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, die EC-Apoptose innerhalb einer vierwöchigen Behandlungsdauer hochgradig reduziert. Weiterhin ging auch eine Diabetes-Erkrankung mit gesteigerter EC-Apoptose einher. Dies könnte mit Ergebnissen aus *in vitro*-Studien erklärt werden, die zeigen, daß hohe Glukosekonzentrationen die EC-Apoptose induzieren (Baumgartner-Parzer S.M., Wagner L., Pettermann M.,

Grillari J., Gessl A., Waldhausl W. *Diabetes*. 1995; 44: 1323-1327; Ho F.M., Liu S.H., Liao C.S., Huang P.J., Lin-Shiau S.Y. *Circulation*. 2000; 101: 2618-2624).

Darüber hinaus sind Patienten mit Diabetes durch vermehrten oxidativen Stress, einem der wirksamsten Auslöser von EC-Apoptose *in vitro*, charakterisiert (Rössig L., Dimmeler S., Zeiher A.M. *Basic. Res. Cardiol.* 2001; 96: 11-22). Schließlich weisen auch die hier vorgelegten Befunde auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer niedrig-gradigen Entzündung und EC-Apoptose hin, insbesondere durch den Befund, daß der Serumspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP), eines etablierten Entzündungsmarkers, signifikant mit EC-Apoptose einhergehend, und zwar nicht nur bei Patienten mit CAD, sondern auch bei gesunden Kontrollpersonen. Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten haben gezeigt, daß Entzündungsmediatoren eine EC-Apoptose wirksam stimulieren (Robaye B., Mosselmans R., Fiers W., Dumont J.E., Galand P. *Am. J. Pathol.* 1991; 138: 447-453). Andererseits erwiesen sich CRP-Serumkonzentrationen als zuverlässige Vorhersagefaktoren für die Progression einer atherosklerotischen Erkrankung, die von klassischen CAD-Risikofaktoren unabhängig ist (Blake G.J., Ridker P.M. *Circ. Res.* 2001; 89: 763-771). Insgesamt stärkte der signifikante Zusammenhang zwischen apoptotischen EC und CAD-Risikofaktoren weiter das Konzept, daß die Anzahl von zirkulierenden apoptotischen EC tatsächlich mit der Aktivität einer atherosklerotischen Erkrankung im Zusammenhang stehen.

Die Erfindung soll nun im folgenden anhand der Beispiele unter Bezugnahme auf die beige-fügten Figuren näher beschrieben werden, ohne jedoch darauf beschränkt zu werden. In den Figuren zeigt:

Figur 1: Durchflußzytometrie-Messung zirkulierender EC.

Zirkulierende Zellen aus peripherem Blut wurden nach Lyse der Erythrozyten analysiert. *Oben links:* In der Darstellung der Vorwärts/Seitwärts-Streuung (*Forward Scatter*, *FSC/Sideward Scatter*, *SSC*) wurden Plättchen und Debris für die weitere Analyse ausgeblendet (Region R2). *Oben rechts:* anti-CD45-perCP-Färbung (Kanal FL-3, *oben*, vs. Isotyp-Kontrolle, *unten*) um zirkulierende Zellen, die keine Leukozyten sind, für die weitere Analyse zu identifizieren (Region R1, blau). *Links unten:* CD45⁻-Zellen wurden zur Quantifizierung von CD146- (FITC-konjugiert, Kanal FL-1) und vWF- (gefärbt mit einem PE-markierten sekundären Antikörper, Kanal FL-2) doppelt positiven Zellen eingegrenzt (gelbe Markierung). *Unten rechts:* Falsch-positive Signale nach Färbung mit Isotyp-Kontrollantikörpern

wurden von den Originaldaten subtrahiert und die resultierende EC-Zahl wurde unter Bezug auf die Zahl der weißen Blutzellen (*White Blood Cells*, WBC) normalisiert.

Figur 2: Anzahl zirkulierender apoptotischer EC (A) und relatives Verhältnis bezogen auf die insgesamt zirkulierenden EC (B) bei gesunden, altersgemäßen Kontrollpersonen ($n = 41$), Patienten mit stabiler Angina (SA; $n = 29$) und Patienten mit ACS (UA, *Unstable Angina* und MI, Myokardinfarkt; $n = 27$).

Figur 3: Wirkung einer prospektiven Behandlung mit Atorvastatin (20 mg/Tag, 4 Wochen) bei $n = 8$ Patienten mit SA auf die Anzahl der zirkulierenden apoptotischen EC (A) und auf den Anteil der apoptotischen EC an insgesamt zirkulierenden EC (B).

Figur 4: Verhältnis zwischen zirkulierenden apoptotischen EC und AC133⁺/KDR⁺ endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit CAD.

Beispiele

Material und Methoden

1. Patienten

Insgesamt wurden 56 Patienten untersucht. 29 Patienten litten seit drei Monaten unter stabiler Angina (SA), definiert als angiographisch dokumentierte koronare Arterienerkrankung und Stabilität der Angina unter Belastung, bevor die Blutproben gewonnen wurden. 27 Patienten mit instabiler Angina (unstable angina, UA), definiert als Angina pectoris *de novo*, Angina pectoris *crescendo* oder Angina pectoris unter Ruhebedingungen (14 Patienten) bzw. bei denen innerhalb der letzten 7 Tage ACS (Troponin T-positiv ohne Hebung der ST-Strecke) oder ein akuter Myokardinfarkt (MI), verbunden mit einer ST-Hebung, aufgetreten war (13 Patienten), wurden untersucht. Ausschlusskriterien waren klinische oder biochemische Anzeichen einer begleitenden entzündlichen Erkrankung, chronische Niereninsuffizienz oder eine maligne Erkrankung. Bei allen Patienten wurde eine koronare Arterienerkrankung nachgewiesen, wobei die auslösende Läsion durch Koronarangiographie identifiziert wurde. Die klinischen Charakteristika dieser Patienten sind in *Tabelle 1* unten zusammengefaßt. 41 gesunde Personen, bei denen sich aus ihrer Anamnese oder aufgrund einer körperlichen Untersuchung kein

Hinweis auf CAD ergeben hatte und die hinsichtlich ihres Alters den Patienten entsprachen, dienten als Kontrollgruppe.

Tabelle 1:

Faktor	Kontrolle	SA	UA/MI
n	41	29	27
Alter	58 ± 1	60 ± 2	61 ± 2
Geschlecht (m/w)	30/11	23/6	19/8
HTN (%)	-	19 (66)	20 (74)
Diabetes mellitus (%)	-	7 (24)	10 (37)
Nikotin (%)	-	17 (59)	15 (56)
Familiengeschichte (%)	-	17 (59)	12 (44)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	132 ± 6	123 ± 7	134 ± 9
HDL/LDL-Rate	0,47 ± 0,04	0,43 ± 0,04	0,32 ± 0,02
CRP (mg/dl)	0,47 ± 0,06	0,65 ± 0,09	2,00 ± 0,35
x-Gefäß	-	2,00 ± 0,27	1,96 ± 0,17
LVEF (%)	-	49,78 ± 3,07	48,83 ± 2,67

Zusätzlich wurden 8 Patienten mit stabiler Angina prospektiv mit Atorvastatin (20 mg/Tag, vier Wochen) behandelt. Die klinischen Charakteristika dieser Patienten sind in *Tabelle 2* unten zusammengefaßt.

Tabelle 2:

n	8
Alter	66 ± 4
Geschlecht (m/w)	6/2
HTN (%)	5 (63)
Diabetes mellitus (%)	2 (25)
Nikotin (%)	5 (63)
Familiengeschichte (%)	4 (50)
LDL-Cholesterin (mg/dl) prä	155 ± 16
LDL-Cholesterin (mg/dl) post	86 ± 13
CRP (mg/dl)	1,53 ± 0,58
x-Gefäß	2,38 ± 0,32
LVEF (%)	52,9 ± 5,9

Alle Patienten und Kontrollpersonen hatten schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt/Main, genehmigt.

Bei allen Patienten wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung auch Serum zur Bestimmung der Konzentrationen von CRP und hsCRP (turbidimetrischer Test, Boehringer Mannheim bzw. Ultrasensitive N Latex CRP Monotest, Behring) sowie der Serumlipid-Fraktionen (Boehringer Mannheim) gesammelt.

2. Durchflußzytometrie

Die Erythrozytenlyse in 10 ml peripherem venösem Heparinblut wurde mit Hilfe einer kommerziell verfügbaren Lyse-Lösung (Becton Dickinson, BD) durchgeführt. Dann wurden die zirkulierenden EC unter Verwendung eines geeignet modifizierten Protokolls nach dem Verfahren von Mancuso *et al.* und Monestiroli *et al.* (Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. *Blood*. 2001; 97: 3658-3661; Monestiroli S., Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Dell'Agnola C., Gobbi A., Martinelli G., Bertolini F. *Cancer Res*. 2001; 61: 4341-4344) mittels 4-Kanal-FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Analyse untersucht (*Figur 1*). Zunächst wurde in der Darstellung der Seitwärts/Vorwärts-Streuung ein regionales Fenster definiert, um Plättchen und Debris aus den weiteren Analysen auszuschließen. Unter den verbleibenden Zellen wurde die Anzahl der CD45⁺-Signale, identifiziert mit einem direkt perCP-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen menschliches CD45 (BD), quantifiziert, um jede gemessene Zellpopulation im Hinblick auf die Gesamtzahl der Leukozyten im Verhältnis zur WBC-Zahl zu normalisieren. Um reife EC spezifisch nachzuweisen, wurden nur CD45⁺-Zellen weiter analysiert, und zwar durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen die EC-spezifischen Epitope CD146 (Mel-CAM, MUC18, S-Endo-1; Shih I.M. *J. Pathol.* 1999; 189: 4-11) (monoklonaler Maus-Antikörper, direkt FITC-konjugiert; Chemicon) und gegen von Willebrandt-Faktor (vWF) (Kaninchen, Oncogene), gefolgt durch einen PE-konjugierten anti-Kaninchen sekundären Antikörper. Alternativ wurde menschlicher KDR mit einem anti-KDR-Antikörper der Maus (Sigma), gefolgt durch einen PE-konjugierten anti-Maus sekundären Antikörper zusätzlich zu vWF nachgewiesen. CD45⁺/CD146⁺/vWF⁺ oder CD45⁺/KDR⁺/vWF⁺-Zellen wurden als reife EC definiert. Diese Zellpopulationen wurden auf Annexin V-Bindung mittels Inkubation mit primären Annexin V-APC-Konjugaten (Bender Medical Systems) untersucht (van Engeland M., Nieland L.J., Ramaekers F.C., Schutte B.,

Reutelingsperger C.P. *Cytometry*. 1998; 31: 1-9). Isotyp-identische Antikörper dienten als Kontrollen (IgG1-PE und IgG2 α -FITC, BD), und die Annexin-Bindung wurde durch Inkubation mit Streptavidin-gekoppelten APC oder mit Isotyp-spezifischen APC überprüft. Eine Färbung nach Inkubation mit Isotyp-Kontrollantikörpern wurde als falsch-positiv beurteilt und von den Originaldaten abgezogen (*Figur 1*, unten rechts). Jede Analyse beinhaltet 100.000 Signale.

Der Nachweis endothelialer Vorläuferzellen wurde in einer Teilgruppe der Patienten durchgeführt, wie bereits früher beschrieben (Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. *Circ. Res.* 2001; 89: E1-7). 100 μ l peripheres Blut wurden mit FITC- oder perCP-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen menschliches CD34 (BD) inkubiert. Als ein Set an sekundären Markern, die unreifere Vorläuferzellen erkennen, wurden Blutproben mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliches CD133 (Milteny; PE-konjugiert) und gegen menschliches KDR (Sigma), gefolgt durch einen FITC-konjugierten sekundären Antikörper, immungefärbt. Isotyp-identische Antikörper dienten als Kontrollen (BD). Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd fixiert, bevor 60.000 Signale analysiert wurden.

3. Statistik

Die Daten werden angegeben als Mittelwert \pm SEM. Kontinuierliche Variablen wurden auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Eine statistische Analyse wurde mittels T-Test für den Vergleich zweier behandelter Gruppen (Varianzanalyse: Levene-Test) und für mehrere Gruppen durch die einseitige ANOVA-Analyse, gefolgt durch *post hoc*-Analyse mit LSD-Korrektur, durchgeführt. Kategorische Variablen wurden mit Hilfe des Fischer's-Exakt-Test verglichen. Eine lineare Regressionsanalyse und nicht-parametrische zweidimensionale Korrelationen (*Spearman Rank Correlation Coefficient* [rs]) wurden verwendet, um die Anzahl zirkulierender apoptotischer EC mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren (*Cardio Vascular Risk Factors*, CVRF) zu korrelieren. Statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn die Null-Hypothese bei $p = 0,05$ verworfen werden konnte. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows 9,0 (SPSS, Inc.) durchgeführt.

Beispiel 1

Um die Anzahl von zirkulierenden apoptotischen EC zu bestimmen, wurden FACS-Analysen bei Patienten mit stabiler Angina (SA, n = 29), instabiler Angina (UA, n = 14) oder Myokardinfarkt (MI, n = 13) durchgeführt und mit 41, hinsichtlich Alter und Geschlecht entsprechenden, gesunden Kontrollpersonen verglichen. Zirkulierende apoptotische EC wurden definiert als Zellen, bei denen ein Nachweis der endothelialen Markerproteine CD146 und vWF positiv war und Annexin V-Bindung stattfand. Außerdem wurden ausschließlich CD45⁺-Zellen in die Analyse mit aufgenommen, um potentiell kontaminierende Leukozyten auszuschließen. Eine repräsentative Analyse wird in *Figur 1* gezeigt.

Patienten in akuten Stadien von CAD, definiert als ACS (instabile Angina und Myokardinfarkt, n = 27), zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen oder zu Patienten mit stabiler CAD signifikant höhere Konzentrationen an zirkulierenden apoptotischen EC (*Figur 2A*). Außerdem waren die Konzentrationen an apoptotischen EC in Patienten mit stabiler CAD zweifach höher als in gesunden Kontrollen (*Figur 2A*).

Frühere Studien hatten bereits gezeigt, daß die Gesamtzahl an zirkulierenden EC bei ACS erhöht ist (Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V., Fabian J. *Klin. Wochenschr.* 1978; 56: 1033-1036; Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Shampol J., Dignat-George F. *Blood.* 1999; 93: 2951-2958). Deshalb wurde zusätzlich das Verhältnis an apoptotischen EC zur Gesamtzahl an zirkulierenden Zellen quantifiziert, um auszuschließen, daß der Anstieg der insgesamt zirkulierenden EC die Anzahl an apoptotischen EC fälschlicherweise erhöht. Allerdings war der Anteil apoptotischer EC an der EC-Gesamtzahl auch bei Patienten mit instabiler Angina und Myokardinfarkt signifikant erhöht (*Figur 2B*).

Der Anstieg von apoptotischen EC in Patienten mit ACS konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wenn ein anderes Set an endothelialen Markern, nämlich einem Rezeptor für Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), VEGF-Rezeptor-1 (KDR), und vWF, für eine Doppelfärbung verwendet wurde. Obwohl die Gesamtzahl an apoptotischen EC niedriger war, wenn KDR und vWF als EC-Marker verwendet wurden, zeigten auch hier Patienten mit instabiler Angina und Myokardinfarkt signifikant höhere Konzentrationen an zirkulierenden apoptotischen EC im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (UA/MI: $0,78 \pm 0,20/\mu\text{l}$ vs. Kontrolle: $0,37 \pm 0,05/\mu\text{l}$; $p < 0,005$). Dementsprechend wiesen Patienten mit CAD nicht nur hochgradig gesteigerte Konzentrationen an zirkulieren-

den apoptotischen EC auf, die Anzahl an zirkulierenden apoptotischen EC korrelierte auch mit der Aktivität der Erkrankung, was der signifikante Anstieg bei Patienten mit ACS belegt.

Beispiel 2

Weiterhin wurde der Einfluß von Risikofaktoren für eine Atherogenese, nämlich Alter, Geschlecht, Bluthochdruck, Diabetes, Rauchen, eine hinsichtlich CAD positive Familiengeschichte sowie Hypercholesterinämie, auf zirkulierende apoptotische EC untersucht. Von diesen allgemein etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren korrelierte eine gleichzeitige, nachgewiesene Erkrankung an Diabetes mellitus signifikant mit einer gesteigerten Anzahl an zirkulierenden apoptotischen EC (*Tabelle 3* unten). Darüber hinaus waren erhöhte Konzentrationen an Serumlipid (LDL-Cholesterin) mit einer gesteigerten EC-Apoptose assoziiert, wohingegen ein hohes HDL/LDL-Verhältnis im umgekehrten Zusammenhang mit der Konzentration an apoptotischen EC stand (*Tabelle 3*). Interessant ist, daß eine klinische Manifestation einer koronaren Arterienerkrankung (Kontrollen vs. stabile Angina vs. ACS) hochgradig mit einer Zunahme an zirkulierenden apoptotischen EC einherging (*Tabelle 3*). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn das Verhältnis von apoptotischen EC zur EC-Gesamtzahl mit den oben beschriebenen Faktoren korreliert wurde (nicht dargestellt).

Tabelle 3:

Faktor	r, zweiseitig	N	p Spearman-Ranks
Alter	0,105	97	0,304
Geschlecht	0,011	97	0,916
HTN	0,051	56	0,712
Diabetes mellitus	0,357	56	0,007
Nikotin	-0,075	56	0,581
Familiengeschichte	-0,077	56	0,573
LDL-Cholesterin	0,222	80	0,048
HDL/LDL-Verhältnis	-0,282	80	0,011
CRP	0,241	84	0,027
UA/MI vs. SA vs. Kontr.	0,496	97	<0,001

Neuere Studien haben Marker einer niedrig-gradigen Entzündung wie C-reaktives Protein (CRP) oder Serumamyloid A als wichtige prognostische Parameter für die Progression einer atherosklerotischen Erkrankung sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit

nachgewiesener CAD etabliert (Blake G.J., Ridker P.M. *Circ. Res.* 2001; 89: 763-771). Deshalb wurde der Einfluß des CRP-Spiegels auf die Apoptose von EC untersucht. Die CRP-Konzentrationen im Serum korrelierten signifikant mit einer gesteigerten EC-Apoptose (*Tabelle 2*). Von Interesse ist auch, daß die CRP-Konzentrationen, gemessen mit einem hochempfindlichen Test, sogar bei den gesunden Kontrollpersonen eine hochgradig signifikante Korrelation mit dem Auftreten apoptotischer EC zeigten ($r = 0,495$; $p < 0,007$).

Beispiel 3

Eine Therapie mit Statinen ist sowohl zur primären als auch sekundären Prävention einer koronaren Erkrankung etabliert, um kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren, was darauf hinweist, daß Statine die Aktivität einer atherosklerotischen Erkrankung reduzieren (Maron D.J., Fazio S., Linton M.F. *Circulation*, 2000, 101, S. 207-213). Deshalb wurde prospektiv untersucht, ob eine kurzzeitige Behandlung mit Atorvastatin (20 mg/Tag, vier Wochen) die EC-Apoptose in Patienten mit stabiler CAD reduziert. *Figur 3* zeigt, daß die Behandlung mit Atorvastatin sowohl die Anzahl an zirkulierenden apoptotischen EC als auch deren Anteil an der Gesamtzahl zirkulierender EC signifikant herabsetzt. Die Statin-Therapie reduzierte auch die LDL-Cholesterin-Konzentration signifikant ($p < 0,02$).

Beispiel 4

Untersucht wurde weiterhin, ob eine gesteigerte Apoptose von CD45⁺ reifen EC mit erhöhten Konzentrationen an endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut im Zusammenhang könnte. Zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen wurden auf das endotheliale Markerprotein KDR und den EC-Vorläufer-Marker AC133 durch immunzytochemische Färbung wie zuvor beschrieben untersucht und analysiert (Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. *Circ. Res.* 2001; 89: E1-7). Es zeigte sich, daß erhöhte Konzentrationen an apoptotischen Endothelzellen signifikant mit einem Anstieg an AC133⁺/KDR⁺ Zellen einherging (*Figur 4*). Eine ähnliche Korrelation wurde beobachtet, wenn die endothelialen Vorläuferzellen als CD34⁺/KDR⁺-Zellen definiert wurden (nicht gezeigt).

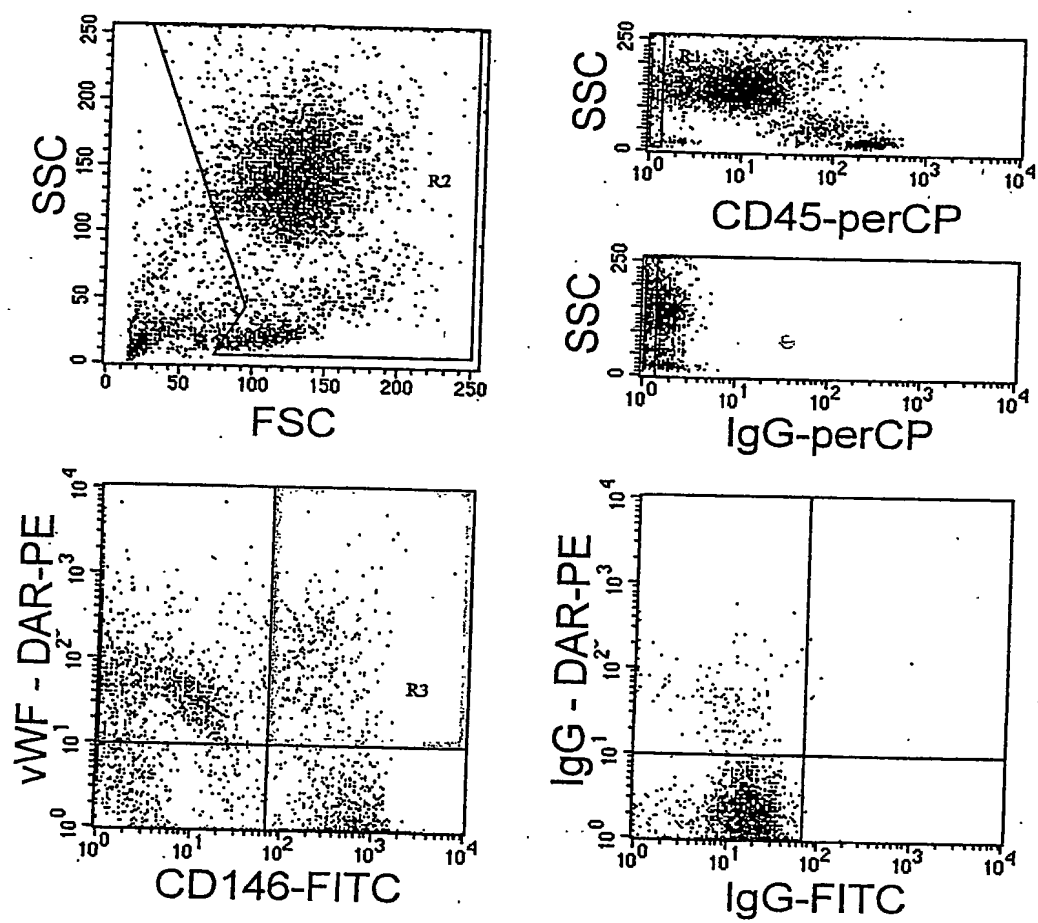
Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang stehenden endothelialen Zellen in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Gewinnung einer zu untersuchenden, endotheliale Zellen enthaltenden Probe;
 - (b) Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an eines oder mehrere der folgende Markermoleküle der endothelialen Zellen binden:
 - Endothelzell-Marker und/oder Apoptose-Marker; oder
 - Endothelzell-Marker und/oder Marker endothelialer Vorläuferzellen;
 - (c) Identifizierung und/oder Quantifizierung der endothelialen Zellen auf Basis der gebundenen Moleküle unter der Verwendung immunzytologischer Methoden; und
 - (d) Vergleich des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit dem Ergebnis einer Referenzprobe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die endothelialen Zellen aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die endothelialen Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus apoptotische Endothelzellen, endothelialen Vorläuferzellen und reifen Endothelzellen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut, Zellkultur-Suspensionen und Suspensionen, die von einer Gefäßwand mechanisch, chemisch und/oder enzymatisch abgelöste Zellen enthalten.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die zu untersuchende Probe peripheres Blut ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei dem peripheren Blut ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die an einen Marker bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern oder Teilen oder Fragmenten davon und Rezeptorliganden oder Teilen davon.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyclonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Fab-Fragmente, scFv-Fragmente und Diabodies umfassen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die an einen Marker bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die an einen Marker bindenden Moleküle an eines oder mehrere Detektionsmoleküle aus der Gruppe bestehend aus Fluoresceinthioisocyanat, Phycoerythrin, Enzymen und magnetisches Bead gekoppelt sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die an einen Marker bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Detektionsmoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Endothelzell-Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CD146, von Willebrandt-Faktor (vWF) und *Vascular Endothelial Growth Factor*-Rezeptor 1 (VEGF-Rezeptor-1).
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Apoptose-Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Annexin V und PD-ECGF.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Marker endothelialer Vorläuferzellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus CD133 und CD 34.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei weiterhin mindestens ein weiterer nicht-endotheliale Zellen kennzeichnender Marker nachgewiesen wird, wie z.B. CD45.

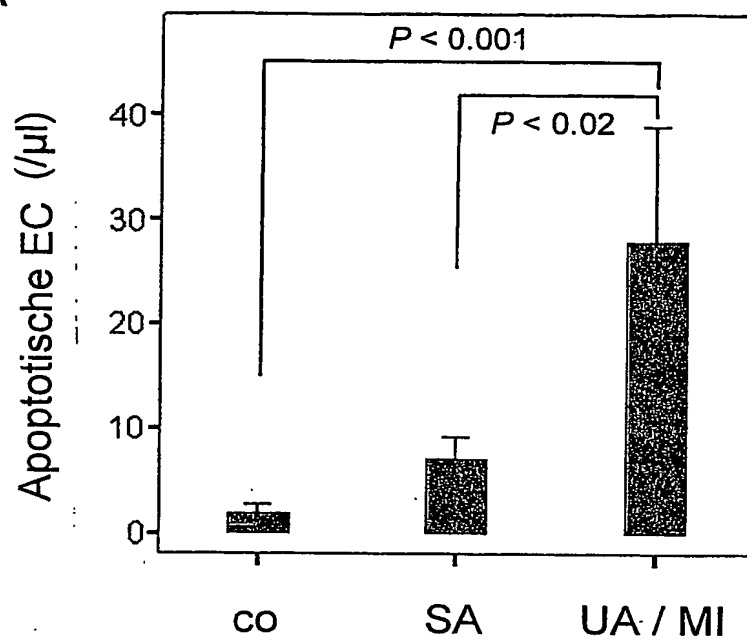
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die immunzytologischen Verfahren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Durchflußzytometrie und Festphase-Immuntests.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Referenzprobe aus einem Säugetier stammt, in dem eine kardiovaskuläre Erkrankung ausgeschlossen wurde.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Ergebnis für apoptotische Endothelzellen mit dem Ergebnis für die Gesamtheit an Endothelzellen in Beziehung gebracht wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Ergebnis für apoptotische Endothelzellen mit dem Ergebnis für endotheliale Zellen in Beziehung gebracht wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, umfassend weiterhin eine Lyse der Erythrozyten zwischen Schritt (a) und (b).
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz.
22. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 21, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen.
23. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 21 zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Therapie die Verabreichung von Lipidsenkern, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Statinen, insbesondere Atorvastatin umfaßt.

Figur 1

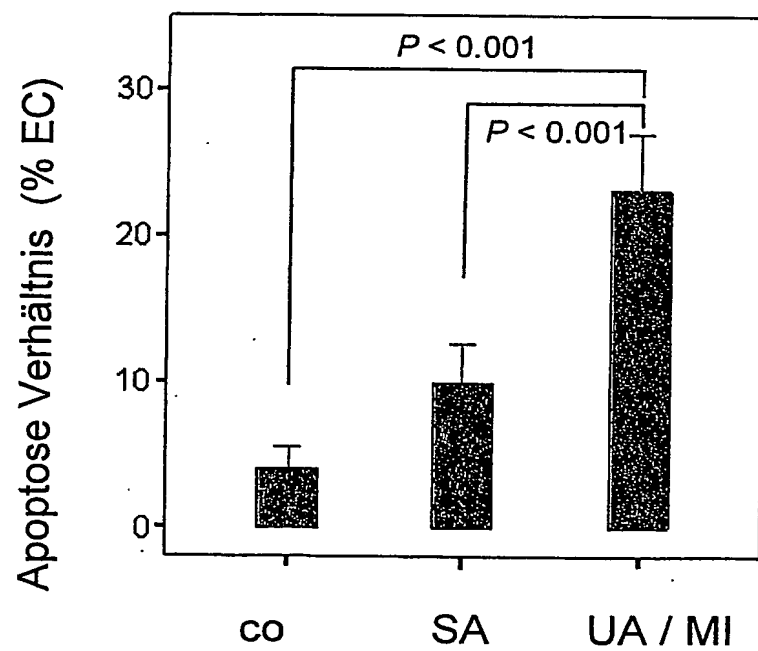


Figur 2

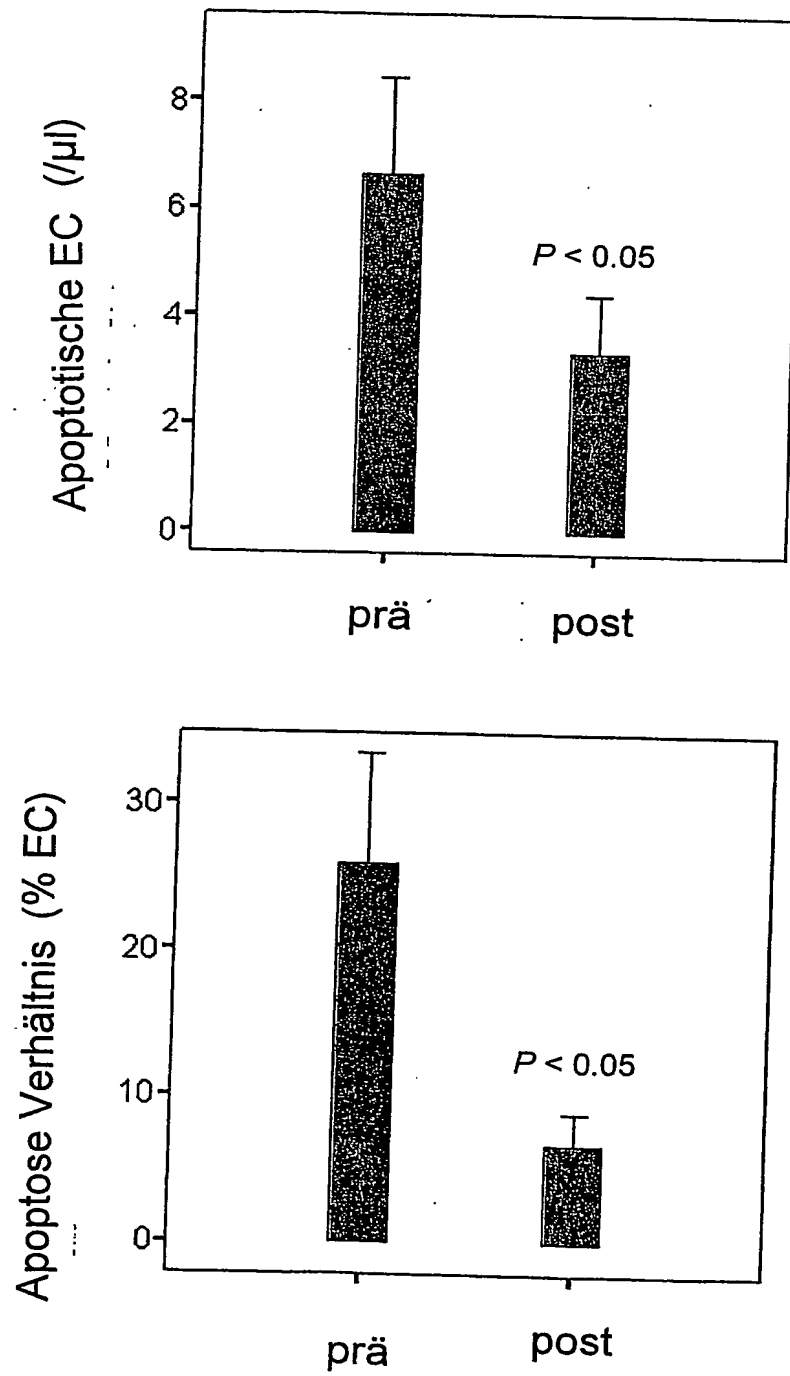
A



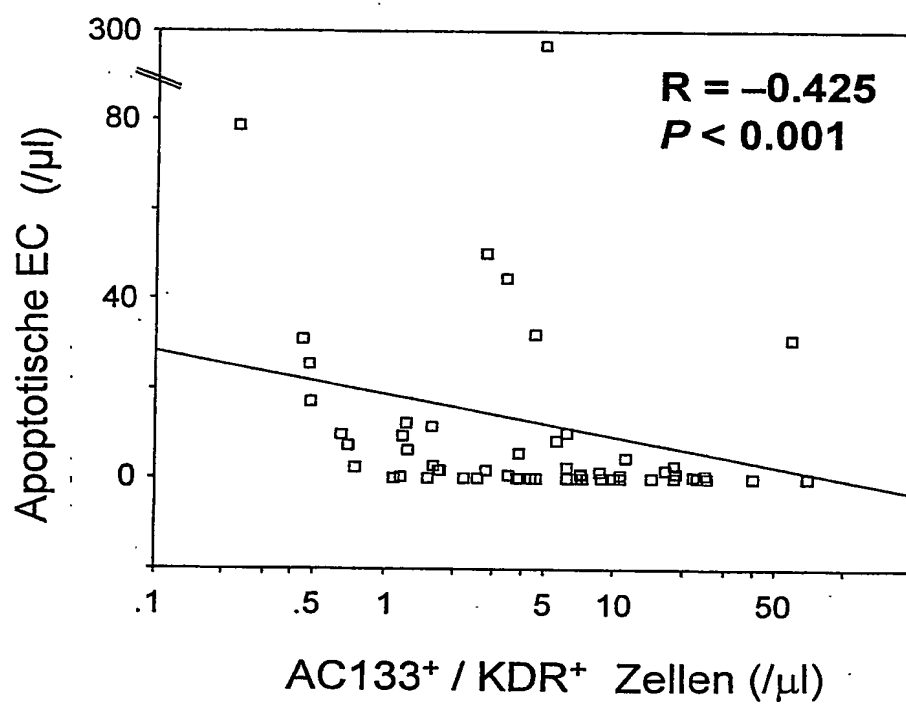
B



Figur 3



Figur. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.